云南植物研究 2009, 31 (2): 138～144
Acta Botanica Yunnanica DOI: 10.3724 SP.J.1143.2009.08150

扇蕨配子体发育与濒危机制的探讨

邓亚妮[1,2], 成 晓[1], 焦 瑜[1], 陈桂菊[3]
(1 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049;
3 山东省济宁市农业科学研究院, 山东 济宁 272031)

摘要: 采用改良 Knop′s 固体培养基、原生境腐殖质土和红壤分别培养扇蕨 (*Neocheiropteris palmatopedate*) 孢子, 光学显微镜及解剖镜下观察记录其孢子萌发及配子体发育过程, 比较了 3 种培养方法对其配子体发育和有性繁殖的影响, 并在此基础上探讨了扇蕨的濒危原因。结果表明: 成熟孢子黄褐色, 赤道面观为豆形, 极面观椭圆形, 单裂缝。孢子萌发类型为书带蕨型, 原叶体发育为槲蕨型。成熟原叶体呈心脏形。毛状体在原叶体阶段出现。有性生殖周期长及配子体发育成幼孢子体的百分率低是扇蕨在配子体世代的主要濒危原因。此外, 红壤固有的理化性质导致扇蕨配子体发育极其缓慢、精子器和颈卵器发生的时间间隔过长使其不能受精产生孢子体。原生植被遭受破坏引起的林下腐殖质土消失、红壤裸露, 加剧了扇蕨的濒危。

关键词: 扇蕨; 配子体发育; 濒危机制
中图分类号: 945.51 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2700 (2009) 02-138-07

The Gametophyte Development and Endangerment Mechanism of *Neocheiropteris palmatopedate* (Polypodiaceae, Fern)

DENG Ya-Ni[1,2], CHENG Xiao[1*], JIAO Yu[1], CHEN Gui-Ju[3]
(1 *Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204, China; 2 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China; 3 *Jining Academy of Agricultural Sciences*, Jining 272031, China)

Abstract: The spores of *Neocheiropteris palmatopedate* were cultured in improved Knop′s medium, in-situ humus soil and red soil respectively. Spore germination and gametophyte development were observed under optical microscope and dissecting microscope, and the impact of four culture methods on the gametophyte development and sexual reproduction was compared. On these experiments, its cause of endangerment was analyzed. The results showed that the mature spores are yellow-brown, monolete, and bean-shaped in equatorial view and elliptical in polar view. The pattern of spore germination is of the Vittaria-type and the gametophyte development of the Drynaria-type. The adult prothalli are cordate. Trichomes occurred in prothallus stage. The long period of sexual reproduction and the low rate at which gametophytes develop into sporophytes are the main reason for the endangerment of *Neocheiropteris palmatopedata* in sporophyte generation. Moreover, the extremely slow development of gametophyte and time interval between the appearance of antheridia and archegonia resulting from the inherent physiochemical property of red soil make it impossible to fertilize and generate sporophyte. Therefore, the disappearance of humus soil under woods and the appearance of red soil caused by primary vegetation destruction aggravate the endangerment situation of *Neocheiropteris palmatopedata*.

Key words: *Neocheiropteris palmatopedata*; Gametophyte development; Endangerment mechanism

扇蕨 (*Neocheiropteris palmatopedata* (Baker) Christ)) 为水龙骨科扇蕨属植物, 分布于云南、四川

通讯作者: Author for correspondence; E-mail: xcheng@mail.kib.ac.cn
收稿日期: 2008-08-01, 2009-01-04 接受发表
作者简介: 邓亚妮 (1984-) 女, 在读硕士研究生, 主要从事蕨类植物保育生物学研究。

和贵州，为我国特有种，其叶形奇特，是观赏蕨类中的珍品。扇蕨还具有清热、理气、祛湿之功效（丁恒山，1982）。

扇蕨为国家二级保护植物（于永福，1999），目前其野生资源已极为稀少，濒临灭绝。野外调查发现，实生孢子体在自然界中数量极少，大部分是通过根状茎繁殖以维持种群，说明该植物配子体发育及有性繁殖有可能存在困难，因此有必要从扇蕨的配子体发育和有性繁殖着手来探讨其濒危原因。在珍稀濒危蕨类植物配子体发育的研究方面，已研究过的种类有：桫椤科植物（Khare and Chandra，1995；Chiou，2000；Huang 等，2000；Huang 等，2001；王金娟等，2007）、对开蕨 *Phyllitis japonica* Kom.（刘保东等，1991）、苏铁蕨 *Brainea insignis*（Hook.）J. Sm.（郭建瑞等，2008）、金毛狗 *Cibotium barometz*（L.）J. Sm.（陈水木等，2007）、水蕨 *Ceratopteris thalictroides*（L.）Brongn.（戴锡玲等，2005）等。目前有关扇蕨配子体的发育过程未见报道。

本文使用改良 Knop′s 固体培养基、原生境腐殖质土及红壤分别培养扇蕨孢子，研究了扇蕨配子体发育的各个阶段，并比较了 3 种培养方法对其配子体发育和有性繁殖的影响，以其对扇蕨的濒危原因有更全面的了解，并为相关类群的系统演化提供基础资料。

1　材料和方法

1.1　孢子的采集

扇蕨的成熟孢子于 2007 年 10 月采自中国科学院昆明植物研究所植物园。将带有成熟孢子的叶片置对折的报纸中，放于干燥通风处使孢子自然散落，约一周后将孢子去杂并收集于硫酸纸袋中，置 4℃冰箱中保存待用。

1.2　方法

取保存的孢子采用 3 种方法培养，定期取样用光学显微镜和解剖镜观察，并用 Cannon Powershot A640 相机照相，研究方法和所用术语参考包文美等（1985）、徐艳等（2004）和张开梅等（2005a，b）文献。

1.2.1　改良 Knop′s 固体培养基（包文美等，1985）培养（A 培养）　将成熟孢子按常规方法处理后接种在改良 Knop′s 固体培养基上，琼脂浓度为 1.2%。接种后将培养皿放入塑料盒中，以玻璃覆盖，盒的底部铺有一层脱脂棉，培养过程中始终确保孢子萌发所需的湿度。先置黑暗处 24 h，以促使其同步萌发。培养室温度 22℃±2℃，24 h 光照，白天自然光照，晚上日光灯光源，光照强度为 2 200 lx。

1.2.2　原生境腐殖质土培养（B 培养）　培养用土为扇蕨原生境昆明西山常绿阔叶林下的腐殖质土，pH 5.2～5.23，有机质含量 13.7%～13.9%，过细筛，120℃灭菌 40 min。将该土壤充分润湿后适量分装于培养皿内，并整平压实。孢子用滤纸包裹后浸入 5% NaClO 溶液中 5～10 min，无菌水冲洗 3～5 次后制成悬浊液均匀撒播在土壤表面。每两天用喷雾器喷水 1 次，以确保孢子萌发所需的湿度。扇蕨配子体性器出现后，每天用喷雾器喷水 1～2 次，以利受精。培养条件同上节。

1.2.3　红壤培养　培养用土为红壤，取自昆明植物园，pH 6.52～6.58，有机质含量 2.42%～2.52%。土壤消毒条件、孢子消毒方法、湿度调节及培养条件同上节。

2　结果和分析

2.1　孢子及孢子萌发

孢子同型，黄褐色，赤道面观豆形（图版Ⅰ：1），极面观椭圆形（图版Ⅰ：2）。孢子大小为 32×54 μm（10 个孢子的平均值），单裂缝（图版Ⅰ：2），约为孢子长度的一半，不具周壁，外壁表面具很稀疏的小瘤。

孢子接种 5 d 后即开始萌发，从孢子壁的单裂缝处伸出一条初生假根（图版Ⅰ：3），孢子壁不脱落或渐脱落，原叶体母细胞中央有一个大而明显的圆球形淡黄色油滴（图版Ⅰ：3），以后随叶绿体数量的增多，油滴逐渐变小直至消失。原叶体母细胞的分裂面与形成假根的分裂面垂直（图版Ⅰ：4），表现为书带蕨型（Vittaria-type）（Nayar and Kaur，1971）。未散出孢子囊的孢子也可以正常萌发。

2.2　丝状体

原叶体母细胞分裂形成基原细胞和原叶体细胞。基原细胞一般不再分裂，而原叶体细胞进行连续的横分裂。有极少数原叶体母细胞先于假根发育（图版Ⅰ：5）。接种后 18 d 左右，形成 3～8 个细胞的单列丝状体（图版Ⅰ：6），或原叶体细胞横裂后纵裂成双分枝的丝状体（图版Ⅰ：7），细胞筒状，侧壁向外鼓出，细胞内叶绿体丰富。在丝状体发育过程中，可由丝状体细胞分裂形成假根（图版Ⅰ：6）。

各培养方式发育为丝状体的时间无显著差

异。红壤培养丝状体阶段较长；B培养的丝状体比A培养和红壤培养的丝状体要肥大；A培养又比红壤培养的丝状体略大。

2.3 片状体

A培养接种25 d左右，丝状体的顶端细胞分裂，由一维生长转为二维生长，形成片状体（图版Ⅰ：8，9）。假根数量随片状体细胞数量的增多而增多。培养皿中的配子体过于密集时，片状体呈细长条状，不向原叶体阶段转化（图版Ⅰ：10）。从接种至片状体阶段，B培养所需天数与A培养的基本相同。红壤上丝状体比A和B培养的丝状体滞后一周左右进入二维生长，之后细胞分裂速度明显减慢，片状体阶段也较长。

2.4 原叶体

A培养接种50 d左右，可见有幼原叶体形成，形状趋于稳定且一致，大多数对称，长大于宽，生长点处略有凹陷（图版Ⅰ：11）。随着幼原叶体逐渐成熟，两翼片不断上延，生长点凹陷逐渐变深，发育为成熟的心形原叶体（图版Ⅰ：12），其类型为槲蕨型（Drynaria-type）（Nayar and Kaur，1971）。成熟原叶体细胞壁厚，叶绿体丰富，生长点附近的细胞小而色深，两翼稍有褶皱，内侧呈“V”字形叉开，偶见两翼片左右交叠（图版Ⅰ：13）。原叶体中肋逐渐增厚，由原来的单层细胞变为多层细胞，向表面鼓起，形成垫状体。从接种至原叶体阶段，B培养需44 d左右；红壤培养需110 d左右，且前者原叶体肥大(图版Ⅰ：14)，宽度大于长度，一般在5～8×4～6 mm之间，后者原叶体形态狭长（图版Ⅱ：1），宽度小于4 mm，长度为3～8 mm。

2.5 毛状体

毛状体见于原叶体阶段，在精子器产生前后出现，可观察到有两种类型的毛状体，一种是由1～3个细胞组成的棒状毛状体（图版Ⅱ：2），一种是具有2～3个细胞长度，具有单细胞分支的多细胞毛状体（图版Ⅱ：3），以后者较为常见。毛状体内始终含有叶绿体。毛状体出现于背腹面中肋及两翼，分布较为稀疏，在原叶体边缘没有分布。

2.6 假根

片状体及幼原叶体的假根多发生在腹面基部及其边缘（图版Ⅰ：9，11），随着原叶体的生长，在中肋处也有分布（图版Ⅰ：12，14；图版Ⅱ：1），但最终不会超过与顶端分生组织平齐的位置。假根呈管状，直径约10～25 μm，长短不一。初为浅褐色，随着原叶体的生长，逐渐变为红褐色。此外，A培养的配子体假根比B培养的数量多且长。

2.7 精子器和颈卵器

A培养接种75 d左右可见精子器形成，其多生于原叶体中下部或假根丛中，每个原叶体上约有十余个（雌雄同株）至数十个（雄性原叶体）不等。精子器于表面呈泡状突起，近圆球形，高约35～48 μm，直径30～45 μm (图版Ⅱ：4)。精子器成熟时，盖细胞孔裂，其孔裂近四边形（图版Ⅱ：5），精细胞逸出。颈卵器在A培养接种85 d左右出现，位于心形原叶体生长点之下，原叶体腹面中肋范围内，并伴随中肋发育不断上延，每个原叶体上约有数个至数十个不等（图版Ⅱ：6），初始为营养细胞产生突起并垂直于原叶体表面。成熟颈卵器细长，颈部由4列细胞组成，3～5个细胞高，约60～65 μm，直径约45～59 μm（图版Ⅱ：7）。卵细胞成熟后，在适宜环境条件下，4个盖细胞彼此分离，露出颈沟（图版Ⅱ：8），以利于精子游入。不论颈卵器盖细胞开裂与否，都存在变褐现象（图版Ⅱ：9）。

B培养产生精子器和颈卵器的时间与A培养类似；红壤培养接种130 d左右可见有精子器发生，170 d左右有颈卵器发生。在数量方面，A培养与B培养差不多，红壤培养比两者均少。

2.8 幼孢子体

精卵结合后，逐渐形成幼胚。B培养接种后160 d左右可见幼孢子体从原叶体上长出，真叶无拳卷现象（图版Ⅱ：10），此时，原叶体仍继续发育，直至幼孢子体发育出2～3片真叶后，其逐渐枯死。幼孢子体上长出的真叶为幼态叶，其形态结构和叶脉与以后长出的叶完全不同。幼孢子体在近叶缘处和叶柄上均有毛状体发生（图版Ⅱ：11，12），且与原叶体一样也有棒状毛状体和分支的多细胞毛状体之分，也以后者居多。红壤上未见有孢子体长出，A培养只有极个别幼孢子体长出，不到1个10皿。B培养出的扇蕨配子体只有20%左右发育为幼孢子体，移栽入盆的成活率可达90%以上。

3　讨论

不同培养方法培养的扇蕨配子体在各阶段存在或多或少的差异，这与不同培养基质的营养条件有关。根据在良好湿热条件下培养于原生境腐殖质土上的配子体发育及有性繁殖情况，表明扇蕨在有性世代的主要濒危原因如下：一是由于精子器和颈卵器出现时间较晚，原叶体发育成幼孢子体所需时间较长，导致有性生殖周期长，在漫长的时间里，易受暴雨和干旱的危害而导致更新困难；二是颈卵器在受精前后均有大量败育，导致配子体发育成幼孢子体的百分率很低。此外，在良好的湿热条件下培养于红壤上的扇蕨配子体，其发育更为缓慢，且颈卵器与精子器发生时间间隔过长，迟迟未长颈卵器，待其长出后，精子器已败育，造成孢子体不能产生。除营养条件外，土壤的物理性质也会影响扇蕨配子体的发育。腐殖质土保水性和透气性好，土壤温度变化慢，有利于扇蕨配子体的发育及受精形成孢子体。红壤保水性差，容易板结，透水透气不良，水分和温度变幅大，再加上扇蕨分布区的季风性气候影响而导致扇蕨在红壤上根本无法完成其配子体发育，这也是我们在野外无腐殖质层的红壤上未见有扇蕨生长的原因。在对滇中地区和四川西南部的实地调查发现，很多地方因为原生植被遭受破坏，林下腐殖质土消失，裸露出红壤，使符合扇蕨生长的土壤条件不复存在，从而在一定程度上加剧了扇蕨的濒危。

扇蕨孢子极面观为椭圆形，赤面观为豆形，单裂缝，这与张玉龙等（1976）关于扇蕨孢子特征的描述是一致的。孢子萌发为书带蕨型，原叶体发育为槲蕨型，具两种类型的毛状体，精子器和颈卵器较小（参考曾汉元和丁炳扬（2003）所用标准），这些都说明了扇蕨在蕨类植物中处于进化较高的地位。

包文美等（1985）在研究了三种不同属的水龙骨科蕨类植物配子体发育过程后表明三者孢子萌发类型为切线型，即书带蕨型，原叶体发育方式为槲蕨型。徐艳等（2004，2005）报道的江南星蕨和阔鳞瘤蕨配子体发育过程及本实验研究的扇蕨也是如此，可能“书带蕨型孢子萌发类型”和“槲蕨型原叶体发育方式”在水龙骨科的发育中具有普遍性。反之，这也说明了配子体有助于阐明蕨类之间的亲缘关系；孢子萌发类型、原叶体发育类型等是可以区分蕨类植物各类群显著性的识别特征（Atkinson and Stokey，1964；Nayar and Kaur，1971）。

在改良 Knop′s 固体培养基接种后 95 d 左右可以观察到不少颈卵器变褐，之后 5 个月鲜见有幼孢子体形成；原生境腐殖质土接种后 95 d 左右也可以观察到不少颈卵器变褐，之后 65 d 左右才见有幼孢子体形成。我们观察到不少盖细胞未分离的已变褐颈卵器，这些变褐的颈卵器还未受精，而张开梅等（2005a，b）认为可以根据颈卵器颜色变褐而判断其卵已受精，我们认为这种方法对扇蕨而言是不适用的。

改良 Knop′s 固体培养基中生长的原叶体有性繁殖率极低，这是因为在无菌培养条件下，局部环境中的空气湿度较低，不利于配子体的受精。本研究虽在控制温度、光照和湿度的条件下成功获得了扇蕨人工孢子体，但用原生境腐殖质土培养的配子体只有 20% 左右发育为幼孢子体，表明扇蕨的有性繁殖确实存在困难。

致谢　在培养基的配制和无菌操作过程中，得到中科院昆明植物研究所纪大干和宋美金老师的帮助。

〔参考文献〕

丁恒山，1982．中国药用孢子植物［M］．上海：上海科学技术出版社，280—281

张玉龙，席以珍，张金谈等，1976．中国蕨类植物孢子形态［M］．北京：科学出版社，358

Atkinson LR，Stockey AG，1964．Comparative morphology of the gametophyte of homosporous ferns［J］．*Phytomorphology*，14：51—70

Bao WM（包文美），Aao ZW（敖志文），Chen FS（陈发生），1985．Studies on the development of gametophytes of ferns from north-eastern China I．Polypodiaceae［J］．*Bulletin of Botanical Research*（植物研究），5（4）：101—114

Chen SM（陈水木），Deng HP（邓洪平），Liu GH（刘光华）*et al.*，2007．Gametophyte development and its diversity in *Cibotium barometz*［J］．*Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*（西北植物学报），27（3）：460—463

Chiou WL，Lee PH，Ying SS，2000．Reproductive biology of gametophytes of *Cyathea podophylla*（Hook.）Copel［J］．*Taiwan Journal of Forest Science*（台湾林业科学），15：1—12

Dai XL（戴锡玲），Jin Q（金沁），Wang QX（王全喜），2005．Studies on the development of gametophyte of *Ceratopteris thalictroides*［J］．

Bulletin of Botanical Research (植物研究), 25 (3): 274—276

Guo JR (郭建瑞), Wu H (吴鸿), Chen X (陈霞) *et al*., 2008. Studies on the development of gametophyte in *Brainea insignis* [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* (热带亚热带植物学报), 16 (2): 160—164

Huang YM, Chiou WL, Lee DH, 2001. Morphology of the gametophytes and young sporophytes of Cyatheaceae native to Taiwan [J]. *Taiwania*, 46: 274—283

Huang YM, Ying SS, Chiou WL, 2000. Morphology of gametophytes and young sporophytes of sphaeropteris lepifera [J]. *American Fern Journal*, 90 (4): 127—137

Khare P, Chandra S, 1995. Gametophyte morphology of an endangered species of *Cyathea* Sm. J. [J]. *Indian Botanical Society*, 75: 103—106

Liu BD (刘保东), Bao WM (包文美), Ao ZW (敖志文), 1991. Studies on the development of gametophyte of *Phyllitis japonica* from China [J]. *Bulletin of Botanical Research* (植物研究), 11 (2): 93—100

Nayar BK, Kaur S, 1971. Gametophytes of homosporous ferns [J]. *Botanical Review*, 37 (3): 295—396

Wang JJ (王金娟), Zhang XC (张宪春), Liu BD (刘保东) *et al*., 2007. Gametophyte development of three species in Cyatheaceae [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* (热带亚热带植物学报), 15 (2): 115—120

Xu Y (徐艳), Shi L (石雷), Liu BD (刘保东) *et al*., 2005. Observation on the gametophyte development of *Phymatosorus hainanensis* (Polypodiaceae) [J]. *Bulletin of Botanical Research* (植物研究), 25 (1): 34—38

Xu Y (徐艳), Shi L (石雷), Liu Y (刘燕) *et al*., 2004. Observation on the gametophyte development of *Microsorium fortunei* (Moore) Ching [J]. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), 21 (6): 660—666

Yu YF (于永福), 1999. The milestone of the work of protecting wild plant of China-The list of Chinese urgently protected wild plants (the1st group) [J]. *Plants* (植物杂志), (5): 3—11

Zeng HY (曾汉元), Ding BY (丁炳扬), 2003. Studies on the gametophytes development in ferns [J]. *Bulletin of Botanical Research* (植物研究), 23 (2): 154—158

Zhang KM (张开梅), Shi L (石雷), Li D (李东), 2005a. The gametophyte development in *Pteris ensiformis* [J]. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), 22 (5): 566—571

Zhang KM (张开梅), Shi L (石雷), Zhang XC (张宪春), 2005b. Observation on the gametophyte development of *Dryopteris subtriangularis* [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), 23 (3): 276—279

图版说明

图版Ⅰ: 1.孢子赤道面观; 2.孢子极面观及单裂缝; 3.孢子萌发 (箭头示油滴); 4.孢子萌发最初两次分裂; 5.原叶体母细胞先于假根发育; 6.单列丝状体及假根; 7.双分枝丝状体; 8～9.片状体; 10.培养过于密集的片状体; 11.幼原叶体; 12.成熟心形原叶体; 13.翼片交叠; 14.原生境腐殖质土上的原叶体 (标尺 = 1～3: 30 μm; 4～7: 100 μm; 8, 9: 200 μm; 10, 11, 13: 500 μm; 12, 14: 1 mm)。

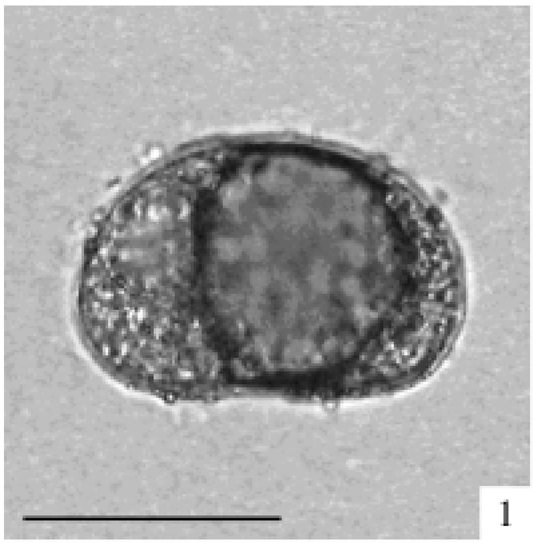
图版Ⅱ: 1.红壤上的原叶体; 2.棒状毛状体; 3.多细胞毛状体; 4.精子器; 5.盖细胞孔裂的精子器; 6.颈卵器群; 7.颈卵器侧面观; 8.颈卵器顶面观; 9.盖细胞未分离的已变褐颈卵器; 10.幼孢子体; 11.幼孢子体近叶缘的毛状体; 12.幼孢子体叶柄上的毛状体 (标尺 = 1, 10: 1 mm; 2～5, 7～9: 30 μm; 6: 200 μm; 11, 12: 100 μm)。

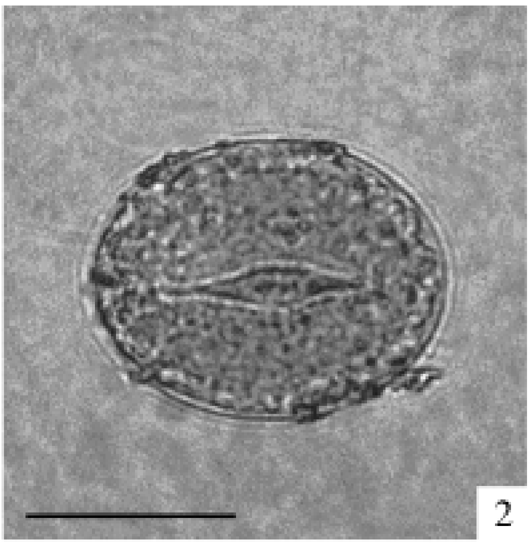
Explanation of Plates

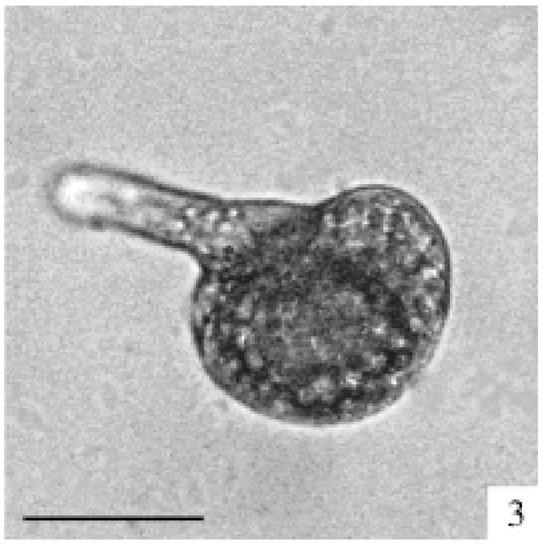
Plate Ⅰ: 1. Spore in equatorial view; 2. Spore in polar view; 3. Spore germination (The arrow shows the oil); 4. The relationship between the appearance of rhizoid and protonemal initials; 5. The mother cell of prothallus developing before rhizoid; 6. Filament of single row of cells and rhizoid; 7. Two-branched filament; 8-9. Prothallial plate; 10. Prothallial of high density; 11. Young prothallus; 12. Adult cordate prothallus; 13. Two wings overlaping each other; 14. Prothallus in in-situ humus soil. (bar = 1-3: 30 μm; 4-7: 100 μm; 8, 9: 200 μm; 10, 11, 13: 500 μm; 12, 14: 1 mm)

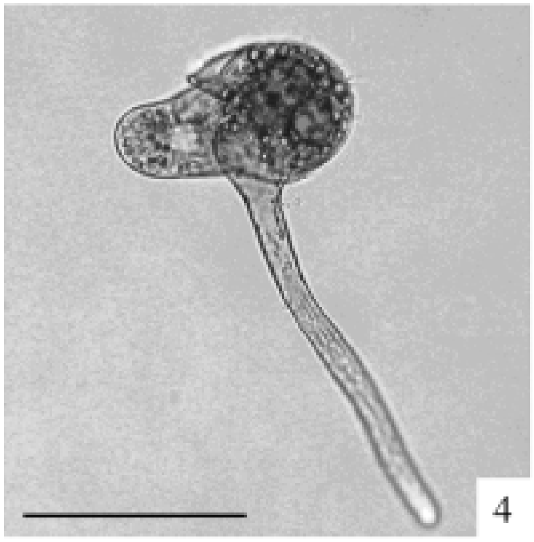
Plate Ⅱ: 1. Prothallus in red soil; 2. Club-shaped hair; 3. Multicellular hair; 4. Antheridium; 5. Antheridium with broken top cell; 6. Archegonium groups; 7. Lateral view of archegoium; 8. Top view of archegoium; 9. Brown archegonium with unseparated top cells; 10. Young sporophyte; 11. Submarginal hair on the young sporophyte; 12. Hair on the petiole of young sporophyte (bar = 1, 10: 1 mm; 2-5, 7-9: 30 μm; 6: 200 μm; 11, 12: 100 μm).

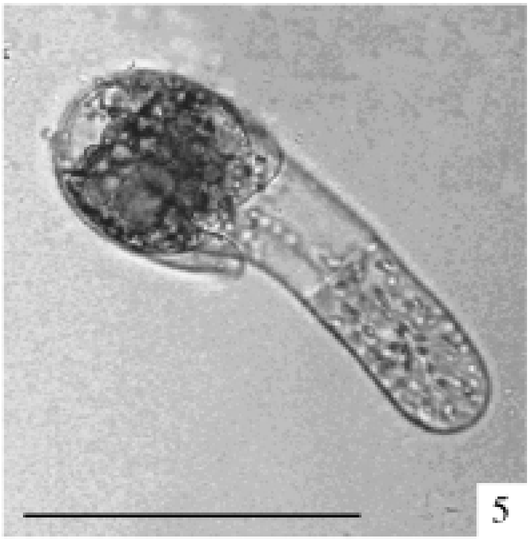
邓亚妮等: 图版 I　　DENG Ya-Ni *et al*.: Plate Ⅰ

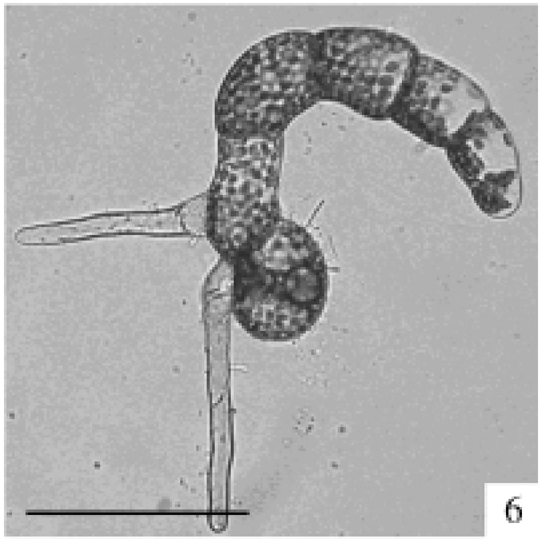

1

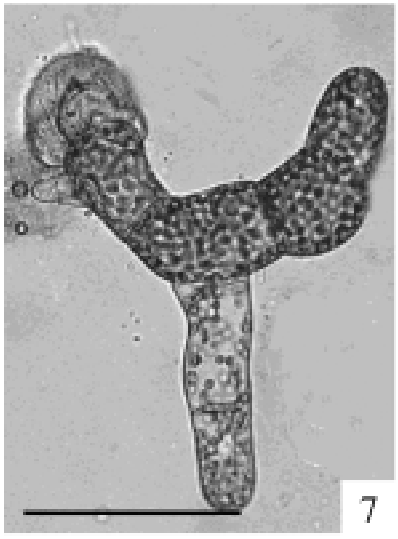

2

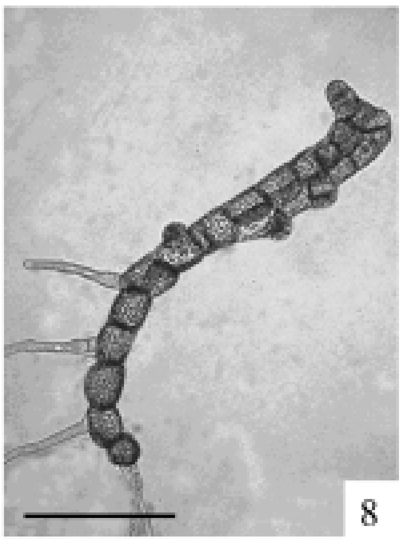

3

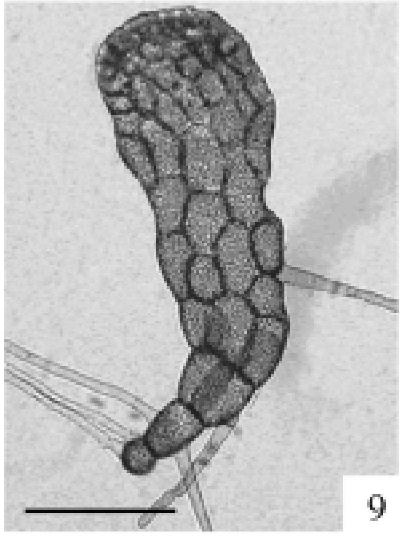

4

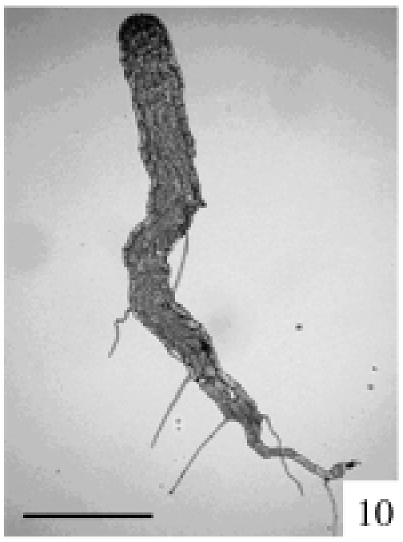

5

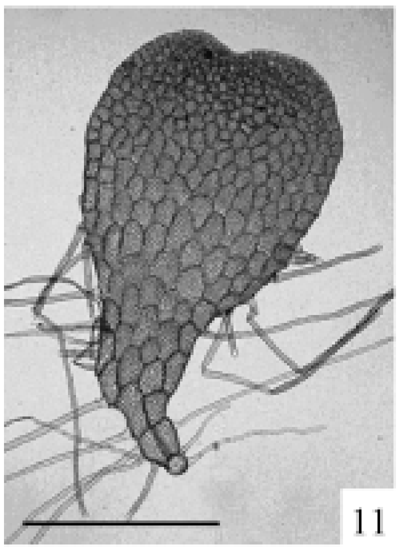

6

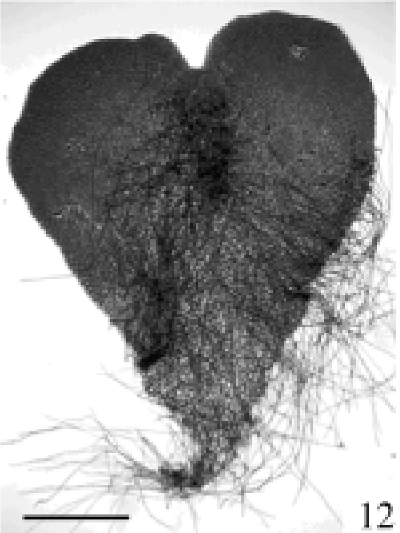

7

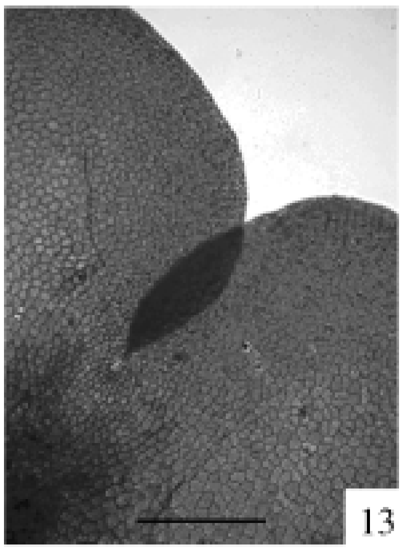

8

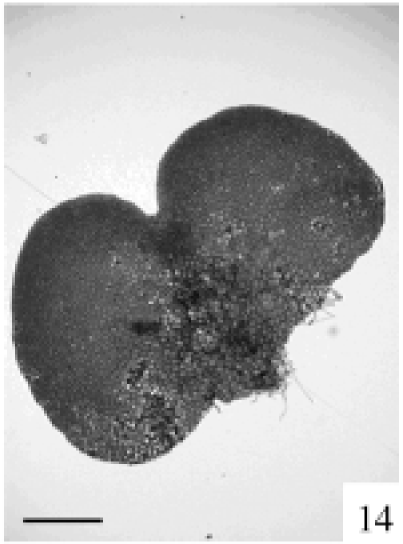

9


10

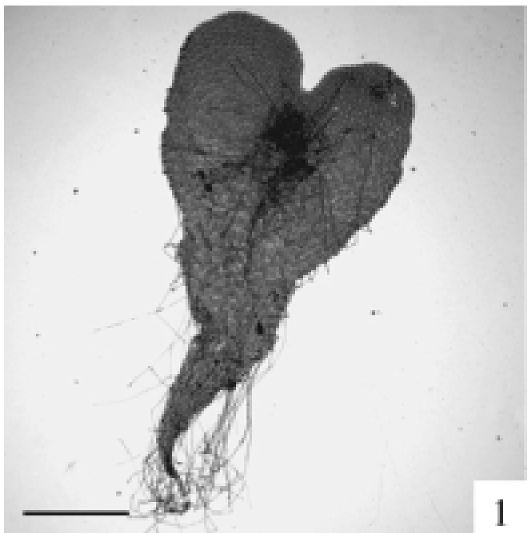

11

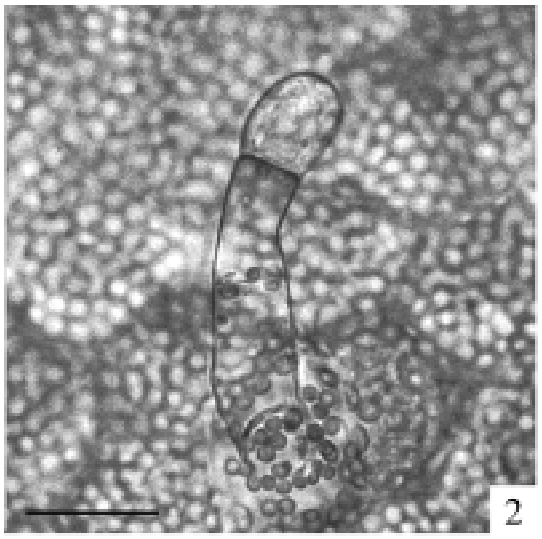

12

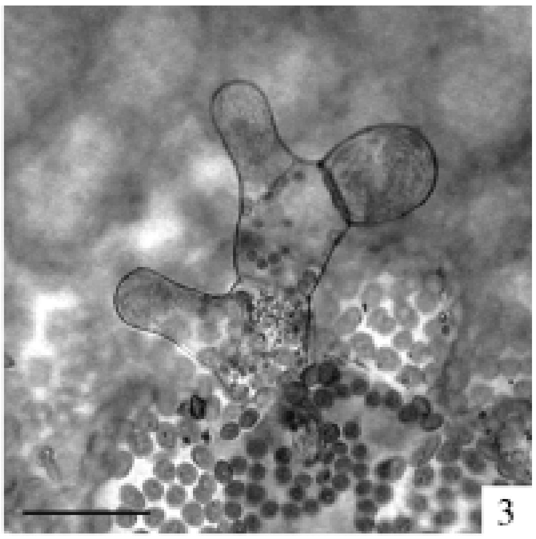

13

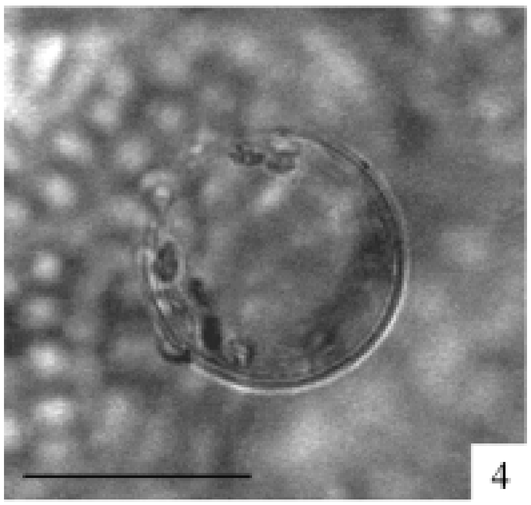

14

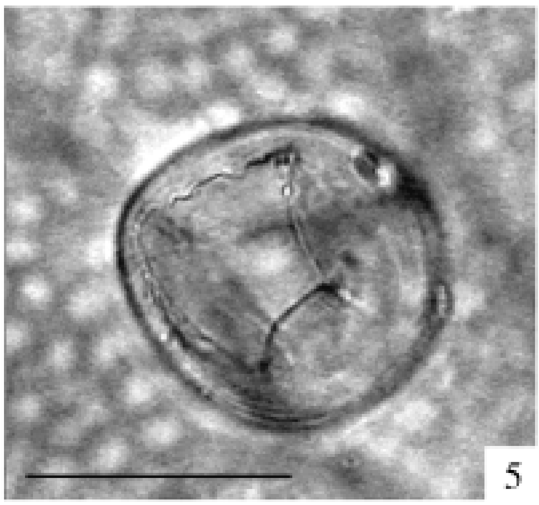
邓亚妮等：图版II　　　DENG Ya-Ni *et al*.: Plate II

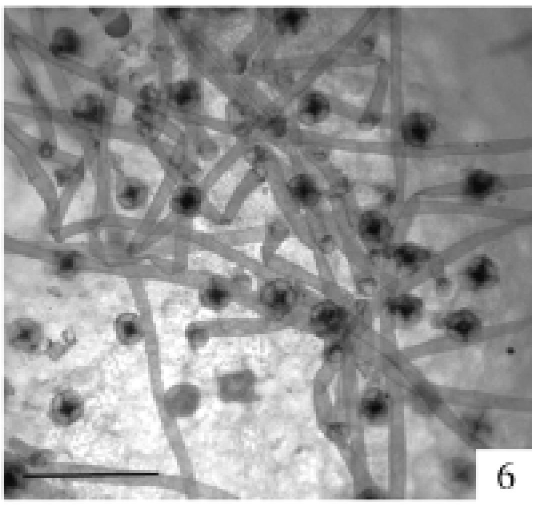

1

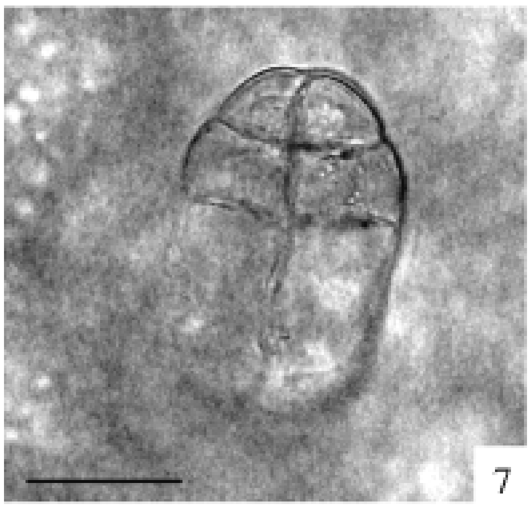

2

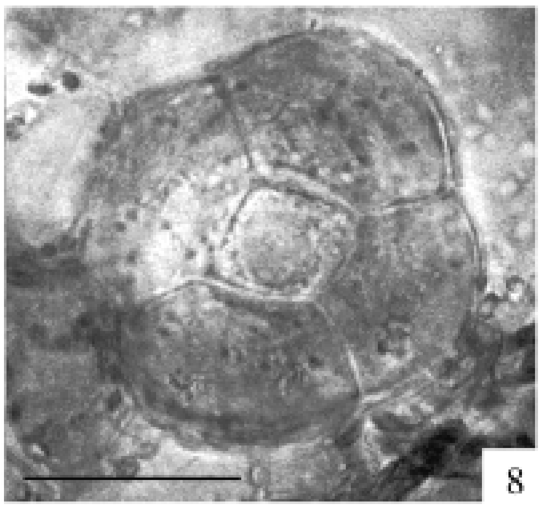

3

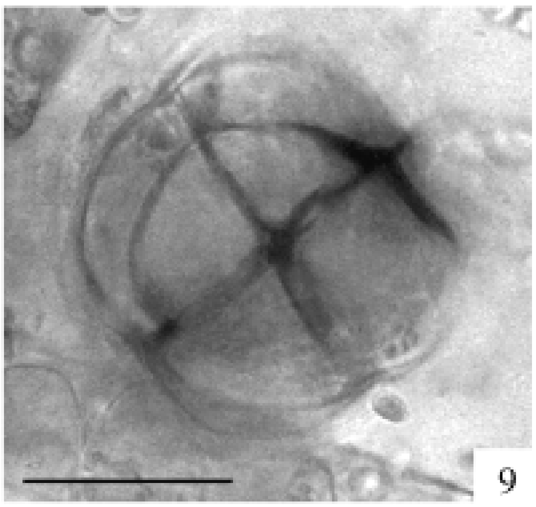

4

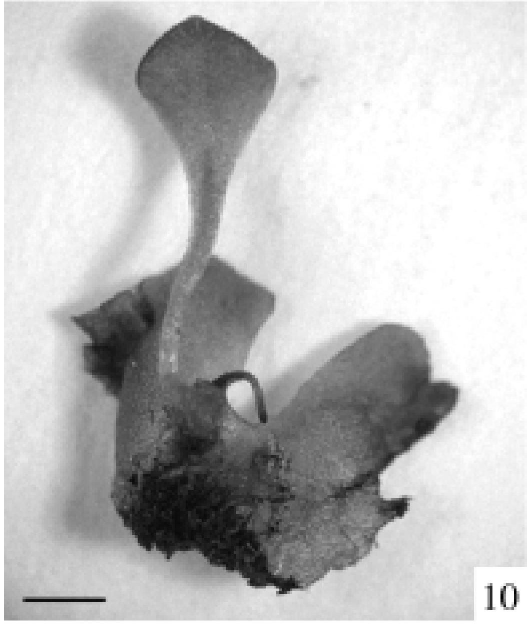

5

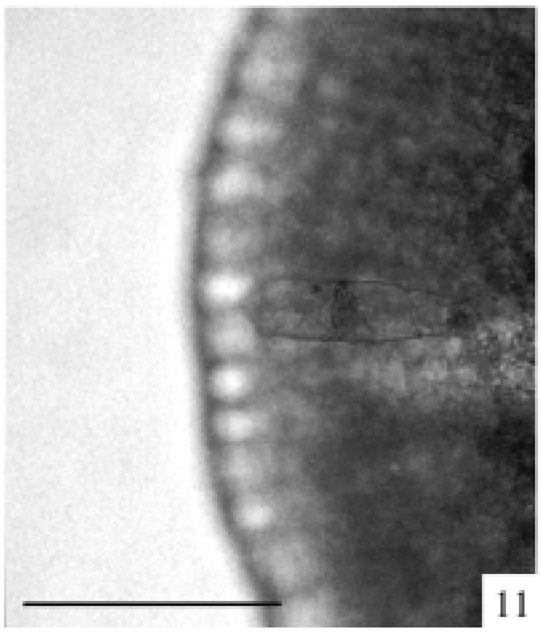

6

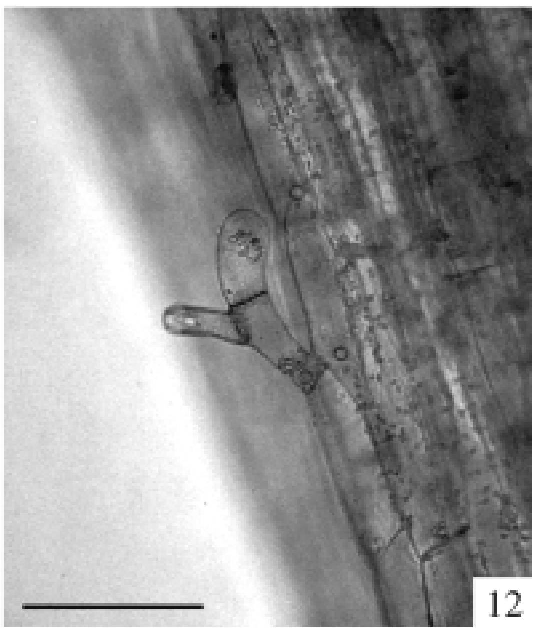

7


8


9


10


11


12